

文章编号: 1000-5013(2009)05-0549-04

# 酚类化合物对发光菌的联合毒性

于瑞莲, 林喜燕, 胡恭任

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 以发光菌为受试生物,测定苯酚和19种取代酚类化合物在 $pH=7.0$ 时的单一毒性,以及等毒性单位配比下二元混合物的联合毒性.采用毒性单位、相加指数、混合毒性指数和相似性参数4种方法对联合毒性进行评价,并探讨联合毒性效应的作用机理.结果表明,苯酚与其他酚类化合物组成的二元混合物对发光菌的联合作用类型大部分表现为协同作用,小部分表现为拮抗或部分相加作用.对于同一联合作用,采用不同的评价方法,其评价结果会稍有差异.

**关键词:** 发光菌; 酚类; 联合毒性; 作用机制

**中图分类号:** X 171.5; TQ 243.1

**文献标识码:** A

随着工农业的高速发展,大量污染物进入到环境中.环境危险因素对生态系统和人类健康的有害效应并不是单一污染物作用的结果,而是各种污染物混合作用的结果.根据单一毒性效应制定的有关评价标准,无法真实地反映环境质量的要求<sup>[1]</sup>.目前,我国对化合物联合毒性作用的研究不多,主要是对重金属联合效应的研究,而对于典型有机污染物的联合作用的研究尚不多见.酚类化合物是重要的化工原料或中间体,它们对环境的污染一直被人们所关注,美、日等国把这类化合物列为重点污染物<sup>[2]</sup>.国内外对酚类化合物的研究多在单一毒性的研究,而对其联合毒性的研究较少.发光菌法因其简便、快速、灵敏、廉价、应用广泛而独具特色,在有毒物质的筛选和环境污染物的生态风险评价等方面具有重要意义<sup>[3]</sup>.本文在酚类化合物对发光菌单一毒性的基础上,进一步研究其联合毒性效应.

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)冻干粉,由中国科学院南京土壤研究所微生物室提供,实验前需进行冻干粉的复苏与培养.

### 1.2 试剂与仪器

(1) 试剂. 20种苯酚类化合物均为分析纯.化合物的标准溶液用质量分数为3%的NaCl溶液配制,用超声波清洗机溶解后定容到棕色容量瓶中. (2) 仪器. 压力蒸汽灭菌器,恒温培养振荡器,生化培养箱,加热磁力搅拌器, DXY-2型生物毒性测试仪, pH计,净化工作台,数控超声波清洗器等.

### 1.3 实验过程

1.3.1 单一毒性测定 用微量可调移液器从培养好的菌液中取出5 mL的发光菌菌液,注入50 mL锥形瓶,并用质量分数为3%的NaCl稀释1~2倍,置于磁力搅拌器上混合均匀后备用.根据预实验,按等对数间距用标准溶液和质量分数为3%的NaCl溶液配制成5个浓度梯度,每个浓度梯度设3个平行样,各吸取2 mL于磨口具塞圆形比色管中;以2 mL质量分数为3%的NaCl( $pH=7.0$ )作空白对照,迅速吸取0.2 mL稀释菌液于各比色管中,加塞,上下振摇若干次混匀,去塞.用生物毒性测试仪在15 min测定发光强度,计算发光抑制率( ).对发光抑制率和浓度对数进行回归分析,直线内插法求出15 min

收稿日期: 2008-11-10

通信作者: 于瑞莲(1970-),女,副教授,主要从事环境污染的研究. E-mail: ruiliany@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2007J0224); 华侨大学科研基金资助项目(06HZR17)

$C_{50,MC}$  (半数有效浓度,Median Effective Concentration)值,实验中室温为  $20 \pm 2$  .

1.3.2 联合毒性的测定 将苯酚分别与其他 19 种酚类化合物按毒性单位比为 1 : 1 的比例混合,组成二元混合体系.通过预实验确定合适的浓度范围,设置浓度时,以毒性较大的化合物的  $C_{50,MC}$  值为准,采用和单一毒性相同的方法,测得各混合体系的 15 min-  $C_{50,MC}$  值.

2 结果与讨论

酚类化合物对发光菌的单一毒性和联合毒性测定值 ( - lg  $C_{50,MC}$  ) ,如表 1 所示.

2.1 单一毒性

从表 1 可看出,对叔丁基邻苯二酚的毒性最大,其 - lg  $C_{50,MC}$  值为 5.87. 这可能与取代基数目及取代基团大小有关.2,4-二氯苯酚的毒性大于邻、对氯苯酚,表明氯代苯酚的毒性随着氯化程度增加而增大.对于相同的取代基,化合物的毒性随取代位置的不同而异,其毒性顺序:对位 > 邻位 > 间位.从取代基特性分析,酚类化合物属极性麻醉(麻醉型)化合物,既具亲电性,又具亲核性<sup>[4]</sup>.因此,不管是吸电子还是给电子取代基,均会使其毒性增强,即取代酚类化合物的毒性大多比苯酚的大.

表 1 酚类化合物对发光菌的单一毒性和联合毒性测定值  
Tab.1 The determined single and joint toxicities of phenols mol · L<sup>-1</sup>

化合物	单一 毒性	联合 毒性	化合物	单一 毒性	联合 毒性	化合物	单一 毒性	联合 毒性
苯酚	2.72	-	邻硝基苯酚	3.48	3.20	2,4,6-三硝基苯酚	2.51	2.77
邻苯二酚	3.14	3.16	间硝基苯酚	3.31	2.97	间苯二酚	2.22	2.56
对硝基苯酚	3.72	3.22	对苯二酚	3.14	2.81	2,4-二硝基苯酚	3.99	2.97
邻氨基苯酚	3.34	3.02	邻甲基苯酚	3.35	2.67	对氨基苯酚	3.27	2.81
间甲基苯酚	3.31	2.64	邻氯苯酚	3.43	3.13	对甲基苯酚	3.71	2.68
对氯苯酚	3.88	3.28	2,3-二甲酚	3.60	2.98	2,4-二氯苯酚	4.01	3.16
2,5-二甲酚	2.91	3.13	对叔丁基邻苯二酚	5.87	3.04			

2.2 联合毒性

从 Bliss 提出联合作用以来,相继出现多种联合作用评价方法.对同一种联合作用,采用不同的评价方法得出的结论也可能有差别,因此,选择恰当的评价方法很重要.由于不同混合物的作用机理可能不同,导致联合作用类型也可能不同,且混合物越多,其相互作用越复杂,这就决定了评价方法的多样性.

(1) 毒性单位 (Toxin Unit, TU) 法<sup>[5]</sup>. 毒性单位 ( $U_T$ ) 的计算式为

$$U_{T,i} = \text{混合物中组分 } i \text{ 的浓度} / \text{化学物 } i \text{ 单独作用的 } C_{50,L} \text{ 值}.$$

其中,  $C_{50,L}$  是某毒性物质使受试生物死亡一半所需的浓度. 当  $U_{T,i} < 0.8$ ,  $U_{T,i} = 1 \pm 0.2$ ,  $U_{T,i} > 1.2$  时,作用类型分别为协同作用、加和作用、拮抗作用.

(2) 相加指数法 (Additive Index, AI)<sup>[6]</sup>. 相加指数 ( $I_A$ ) 的计算式为

$$I_A = 1/U_T - 1.0, \quad U_T \leq 1.0; \quad I_A = 1/U_T + 1.0, \quad U_T > 1.0.$$

其中,  $U_T = \sum U_{T,i}$ . 当  $I_A > 0$ ,  $I_A = 0$ ,  $I_A < 0$  时,作用类型分别为协同作用、简单加和、拮抗作用.

(3) 混合毒性指数法 (Mixtures Toxicity Index, MTI)<sup>[7]</sup>. 混合毒性指数 ( $I_{MT}$ ) 的计算式为

$$I_{MT} = 1 - (\lg \sum U_T / \lg N).$$

其中,  $N$  为混合物中所含组分的数目. 当  $I_{MT} < 0$ ,  $I_{MT} = 0$ ,  $0 < I_{MT} < 1$ ,  $I_{MT} = 1$ ,  $I_{MT} > 1$  时,作用类型分别为拮抗作用、独立作用、部分加和、简单加和、协同作用.

(4) 相似性参数 (Similarity Parameter, SP) 法<sup>[8]</sup>. 相似性参数 ( $\lambda$ ) 的计算式为

$$\lambda = \frac{\sum_{i=1}^n (U_{T,i})^{1/n}}{n}$$

当  $\lambda = 1$ ,  $\lambda > 1$ ,  $0 < \lambda < 1$  时,作用类型分别为简单相加、协同作用、拮抗作用.

采用以上 4 种常见的评价方法对联合毒性效应进行评价,结果如表 2 所示. 由表 2 可知,用毒性单位法来评价,苯酚与取代酚类化合物混合后,大部分表现为协同作用,小部分表现为拮抗作用或部分相

加. 如对苯二酚、邻氨基苯酚, 以及邻、间、对甲酚与苯酚组成的二元混合物表现为拮抗作用. 对叔丁基邻苯二酚和 2,4-二硝基苯酚与苯酚混合后表现为部分相加. 用相加指数法评价所得结论与毒性单位法基本一致, 除了用毒性单位法评价结果表现为部分相加作用的两种化合物(对叔丁基邻苯二酚和 2,4-二硝基苯酚), 用相加指数法评价则分别为表现协同作用和拮抗作用. 用混合毒性指数法评价所得结论与前面两种方法大体一致. 在毒性单位评价中, 表现为拮抗作用的化合物(对苯二酚、邻氨基苯酚及邻、间、对甲酚), 用混合毒性指数法评价则表现为部分相加作用.

表 2 等毒性单位配比下二元混合物的联合毒性

Tab. 2 The binary joint toxicity types of phenol and substituted phenols under the equal toxic								
酚类化合物	$U_T$	联合效应	$I_A$	联合效应	$I_{MT}$	联合效应	联合效应	联合效应
邻苯二酚	0.528	协同作用	0.893	协同作用	1.920	协同作用	1.921	协同作用
间苯二酚	0.687	协同作用	0.456	协同作用	1.540	协同作用	1.542	协同作用
对苯二酚	1.628	拮抗作用	- 0.628	拮抗作用	0.300	部分相加	0.297	拮抗作用
对叔丁基邻苯二酚	0.950	部分相加	0.053	协同作用	1.070	协同作用	1.074	协同作用
邻硝基苯酚	0.561	协同作用	0.783	协同作用	1.830	协同作用	1.835	协同作用
间硝基苯酚	0.899	协同作用	0.113	协同作用	1.150	协同作用	1.154	协同作用
对硝基苯酚	0.581	协同作用	0.722	协同作用	1.780	协同作用	1.784	协同作用
2,4-二硝基苯酚	1.075	部分相加	- 0.075	拮抗作用	0.900	部分相加	0.896	拮抗作用
2,4,6-三硝基苯酚	0.671	协同作用	0.490	协同作用	1.580	协同作用	1.575	协同作用
邻氨基苯酚	1.307	拮抗作用	- 0.307	拮抗作用	0.610	部分相加	0.614	拮抗作用
对氨基苯酚	0.773	协同作用	0.293	协同作用	1.370	协同作用	1.371	协同作用
邻氯苯酚	0.645	协同作用	0.551	协同作用	1.630	协同作用	1.633	协同作用
对氯苯酚	0.511	协同作用	0.958	协同作用	1.970	协同作用	1.969	协同作用
2,4-二氯苯酚	0.694	协同作用	0.441	协同作用	1.530	协同作用	1.527	协同作用
邻甲基苯酚	1.830	拮抗作用	- 0.830	拮抗作用	0.130	部分相加	0.128	拮抗作用
间甲基苯酚	1.910	拮抗作用	- 0.910	拮抗作用	0.070	部分相加	0.067	拮抗作用
对甲基苯酚	1.989	拮抗作用	- 0.989	拮抗作用	0.010	拮抗作用	0.008	拮抗作用
2,3-二甲酚	0.964	协同作用	0.037	协同作用	1.050	协同作用	1.052	协同作用
2,5-二甲酚	0.473	协同作用	1.116	协同作用	2.080	协同作用	2.081	协同作用

由表 1 可以发现, 苯酚与邻、间、对甲酚混合后, 其  $-lg C_{50,MC}$  值均小于苯酚、邻、间、对甲酚单独作用的  $-lg C_{50,MC}$  值. 这说明苯酚与邻、间、对甲酚混合后的联合作用应该是拮抗作用, 而不是部分相加作用. 由此可见, 用毒性单位法和相加指数法评价混合体系更为恰当.

苯酚与对苯二酚、邻氨基苯酚混合后, 其  $-lg C_{50,MC}$  值分别为 2.81, 3.02, 与苯酚(2.72) 相差不大, 有可能表现为部分相加. 由此可见, 用混合毒性指数法评价该混合体系更适合. 以上两组数据进一步表明了, 不同的混合体系应该有适合该体系的评价方法.

4 种评价方法对联合作用效应的评价结果大体一致, 其中以毒性单位法和混合毒性指数法的判定灵敏性较高. 在探讨有毒化合物联合毒性问题时, 尤其是在化合物联合作用方式可能为非协同作用时, 需多选用几种方法对实验结果进行评价, 从中选择适合该体系的评价方法.

3 联合毒性的作用机理

毒理学家们经过多年研究, 从有机物在生物体内的运转过程和有机物活性中心与酶靶分子之间的相互作用出发, 先后提出了膜通透性理论和酶抑制或诱导理论. 膜通透性理论认为, 在毒物动力学相中, 一种化合物可改变细胞膜的结构, 从而改变膜的通透性, 加大或减弱生物体对其他化合物的吸收, 使混合体系的生物毒性增强或减弱. 酶抑制或诱导理论认为, 混合体系中一种化合物对其他化合物代谢酶抑制或诱导作用, 是产生拮抗、协同等联合作用的重要原因.

一般认为, 化学性质相似或属于同系物质, 作用于机体的同一部位或组织的毒性近似, 作用机理也类似. 混合后, 其联合效应多表现为相加作用<sup>[9]</sup>. 酚类化合物属同系物, 研究结果却大部分表现为协同作用. 这可能是引入了其他基团, 出现其他结合点, 即苯酚与取代酚类化合物的作用机理不完全一致.

根据 Funnel 假说,混合物的作用类型与混合物中所含组分数目、化合物的浓度及实验采用的测定指标有关.混合物所含组分越多,其联合效应越接近于相加作用.如果所选的生化指标需要较高的毒物浓度(如半数致死剂量  $C_{50,MC}$ ),联合效应就偏离相加作用;如果所选的生化指标需要较低的毒物浓度(如酶活性的测定),则接近于相加作用.实验测定的是苯酚和取代酚类化合物所组成的二元混合物的毒性效应,只有两个组分,并以  $C_{50,MC}$  为生化指标,需相对较高浓度方可测出其变化.根据 Funnel 假说,联合作用应偏离相加作用,实验结果与文[10]的结论一致.

## 4 结束语

研究结果表明,苯酚与取代酚类化合物的混合物的联合效应大部分表现为协同作用,小部分表现为拮抗或部分相加作用.对于同一联合作用,采用不同的评价方法,其评价结果会稍有差异.毒性单位法和混合毒性指数法的判定灵敏性较高,为本研究体系的推荐评价方法.酚类化合物属同系物,研究结果大部分表现为非相加作用,其具体机理有待于进一步探讨.

### 参考文献:

- [1] 郑振华,周培疆,吴振斌.复合污染研究的新进展[J].应用生态学报,2001,12(3):469-473.
- [2] 莫凌云,刘海玲,刘树深,等.5种取代酚化合物对淡水发光菌的联合毒性[J].生态毒理学报,2006,1(3):259-263.
- [3] 阎鹏,孙礼,李百祥.利用发光菌快速检测环境污染物急性毒性的研究概况[J].环境与健康杂志,2001,18(4):250-252.
- [4] VEITH G, MEKENYAN O G. A QSAR approach for estimating the aquatic toxicity of soft electrophiles[J]. Quant Struct-Act Relat,1993,12(4):349-356.
- [5] BRODERIUS S J, KAHL M D, HOGLUND M D. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals[J]. Environ Toxicol Chem,1995,14(9):1591-1605.
- [6] MARKING L L, DAWSON V K. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals[M]. Washington:US Fish and Wildlife Service,1975:1-8.
- [7] KONEMANN H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results[J]. Toxicology,1981,19(3):229-238.
- [8] CHRISTENSEN E R, CHEN C Y. Modeling of combined toxic effects of chemicals: Hazard assessment of chemicals[M]. New York: Hemisphere Publishing,1989:125-186.
- [9] 戴树桂.环境化学[M].2版.北京:高等教育出版社,2006:361.
- [10] 何勇田,熊先哲.复合污染研究进展[J].环境科学,1994,15(6):79-83.

## The Joint Toxicity of Phenols to *Photobacterium phosphoreum*

YU Rui-lian, LIN Xi-yan, HU Gong-ren

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** The single toxicity of phenol and 19 phenols to *Photobacterium phosphoreum* were determined respectively under pH=7.0. The binary joint toxicity examinations were performed for phenol and substituted phenols under the concentration ratio of equal toxic unit. Toxic unit method, additive index method, mixture toxicity index method and similarity parameter method were used to evaluate the joint toxicity. And the mechanism of joint toxicity was also investigated. The results showed that the binary mixtures of phenol and other substituted phenols mostly were synergistic effect and only a few were antagonistic or partly additional effect. For the same joint actions of binary mixtures of phenol and substituted phenols, the evaluated results of joint action types varies slightly with different evaluating methods.

**Keywords:** *Photobacterium phosphoreum*; phenols; joint toxicity; mechanism

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:陈国华)